

# 圆酵母 B84512 单倍体的制备及其产赤藓糖醇特性分析

窦文芳<sup>1</sup>, 高慧<sup>1</sup>, 张旦旦<sup>1</sup>, 张六六<sup>2</sup>, 许正宏<sup>1</sup>, 陆茂林<sup>\*2</sup>

(1. 江南大学药学院, 江苏 无锡 214122; 2. 江苏省微生物研究所, 江苏 无锡 214063)

**摘要:** 圆酵母 B84512 为工业用赤藓糖醇生产菌株, 为获得其遗传育种单倍体亲本, 以 Mcclary 产孢培养基进行该菌孢子萌发, 萌发条件为: 30℃, 培养 7 d, 菌株产孢率为 45%; 以蜗牛酶裂解子囊孢子细胞壁 150 min, 共筛选出 10 株单倍体菌株, 其中 3 株在发酵培养基中合成赤藓糖醇的能力相对较高, 分别命名为 *Torula sp.* B84512-7, *Torula sp.* B84512-8 及 *Torula sp.* B84512-9。经 PCR 验证, 前两者为 α 型, 后者为 a 型。将 3 株单倍体两两杂合, 发现杂合子 *Torula sp.* B84512-79 的发酵性能最佳, 赤藓糖醇产量高达 97 g/L, 约为出发菌株的 56%。赤藓糖醇产量较高的单倍体亲本 *Torula sp.* B84512-7 及 *Torula sp.* B84512-9 可用于基因工程育种。

**关键词:** 圆酵母 B84512; 单倍体; 子囊孢子; 赤藓糖醇

中图分类号: Q 939.97 文献标志码: A 文章编号: 1673—1689(2013)12—1327—06

## Breeding of *Torula sp.* B84512 Haploid and Analysis of Erythritol Production Characteristics

DOU Wen-fang<sup>1</sup>, GAO Hui<sup>1</sup>, ZHANG Dan-dan<sup>1</sup>, ZHANG Liu-liu<sup>2</sup>, XU Zheng-hong<sup>1</sup>, LU Mao-lin<sup>\*2</sup>

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Jiangsu Institute of Microbiology, Wuxi 214063, China)

**Abstract:** The *Torula sp.* B84512 was used for the industrial production of erythritol. To obtain a haploid genetics hybrid breeding of *Torula sp.* B84512, spore-producing cultivation of B84512 were done after cultured on Mcclary medium for 7 days at 30 °C, and the sporulation rate could reach to 45%. Lysing the ascospore cell with snail enzyme for 150 min, 10 haploid strains were screened. Furthermore, 3 of them exhibit the highest ability to produce erythritol, and named as *Torula sp.* B84512-7, B84512-8 and B84512-9, respectively. With the PCR verification, *Torula sp.* B84512-7 and B84512-8 were verified as alpha type but *Torula sp.* B84512-9 was a type. The erythritol production of heterozygous *Torula sp.* B84512-79 reached at 97 g/L which was 56% of that of the parental strain. Therefore, *Torula sp.* B84512-7 and *Torula sp.* B84512-9 could be used for the further genetic manipulation.

**Keywords:** *Torula sp.* B84512, haploid, ascospore, erythritol

收稿日期: 2013-06-03

基金项目: 江苏省科委社会发展基金项目(BE2010629)。

作者简介: 窦文芳(1976—), 男, 山东商河人, 副教授, 主要从事微生物分子改造研究。E-mail: douwenfang@yahoo.com.cn

\* 通信作者: 陆茂林(1961—), 男, 安徽铜陵人, 研究员, 主要从事工业微生物研究。E-mail: jsimlml2012@tom.com

赤藓糖醇具有低热量、高甜度、高耐受性、不致龋齿等特性<sup>[1-3]</sup>,被广泛应用于食品、医药及化工等行业。我国对赤藓糖醇的开发研究较晚,生产上多采用野生菌株,发酵性能较为落后<sup>[4-5]</sup>。Spencer等<sup>[6]</sup>研究发现,耐高渗酵母在耗氧条件下以葡萄糖或蔗糖等为碳源时主要通过 HMP 途径生成赤藓糖醇,即通过磷酸戊糖途径和糖酵解途径产生足够的还原力,生成大量的赤藓糖-4-磷酸,而后在赤藓糖还原酶的作用下脱磷酸生成赤藓糖醇并释放到胞外,在该途径中赤藓糖还原酶催化最后一步反应,被认为是关键酶。Hattori等在研究酵母 *Czeylanoides* 产赤藓糖醇的过程中发现,赤藓糖醇较快积累时转醛酶的活力被显著抑制<sup>[7]</sup>。结合代谢途径分析可知,通过基因工程手段解除产物对 HMP 途径中赤藓糖还原酶、己糖激酶、转醛酶等关键酶的反馈抑制,维持其高活力是获得高产赤藓糖醇的关键。

圆酵母 B84512 是工业用赤藓糖醇生产菌株之一,赤藓糖醇产量在 180 g/L 左右,传统的菌种改良及培养条件优化等手段已难以进一步提升其产量,基因工程育种必将成为解决其产业瓶颈的有效手段之一。圆酵母营养细胞多为二倍体,诱导酵母产孢并获得单倍体是其遗传学和育种工作极为关键的一步<sup>[8]</sup>。单倍体细胞既可用于酵母遗传性状分析,又可作为杂交和分子遗传学研究的亲本<sup>[9-10]</sup>。单倍体细胞的结合型由 MAT 基因座上的等位基因 MAT-a 及 MAT- $\alpha$  决定。在 a 细胞中,a1 基因出现在 MAT-a 基因座上,而在  $\alpha$  细胞中, $\alpha$ 1 和  $\alpha$ 2 基因出现在 MAT- $\alpha$  基因座上。在双倍体细胞中,此两种交配型控制基因都会表达。因此,可根据基因结合位点的不同采用 PCR 的方法进行倍型鉴定,鉴定为异倍体的菌株方可用于杂交或分子操作。

目前,对赤藓糖醇生产菌株圆酵母的单倍体制备及基因工程育种的研究鲜见报道。作者以圆酵母 B84512 为研究对象,在不同产孢培养基上进行产孢实验,确定单倍体分离的最佳条件;以赤藓糖醇产量为主要参量,对所得圆酵母单倍体及其杂合子进行发酵特性分析,筛选出性能优良的单倍体,为圆酵母基因工程育种奠定了基础条件。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 培养基 SPM 产孢培养基(g/L):葡萄糖 1,

氯化钾 0.1,磷酸二氢钾 0.68,酵母膏 2.5,固体培养基加体积分数 2%琼脂。

Mcclary 产孢培养基(g/L):葡萄糖 1,氯化钾 1.8,乙酸钠 8.2,酵母膏 2.5,固体培养基加体积分数 2%琼脂。

YPD 培养基(g/L):酵母粉 10,蛋白胨 20,葡萄糖 20。固体培养基添加体积分数 2%的琼脂,用于酵母菌的培养。

发酵培养基(g/L):葡萄糖 300,酵母粉 10,尿素 1,五水合硫酸铜 0.01,一水合硫酸锰 0.01,pH 自然。

1.1.2 实验试剂及配置方法 石炭酸蕃红染色液:蕃红 0.1 g,体积分数 3%石炭酸 90 mL,体积分数 0.5%酒精 10 mL。

碱性美兰染色液:配制方法按文献[11]进行。

体积分数 3%酸性酒精:100 mL 体积分数 95%酒精加 3 mL 盐酸。

### 1.2 方法

1.2.1 诱导孢子形成方法 将圆酵母 (*Torula sp.*) B84512 接种至 YPD 斜面培养基中,30℃恒温培养 3 d 活化。活化两次后将菌体用无菌生理盐水离心洗涤(3 500 r/min,5 min)3 次,将菌泥涂布在固体产孢培养基中,于 30℃恒温培养 3~8 d。在显微镜下观察视野内子囊孢子形成情况,并计算产孢率。

$$\text{产孢率} = \frac{\text{子囊孢子数}}{\text{总细胞数}} \times 100\%$$

### 1.2.2 子囊孢子的分离及单倍体的获得

1) 用无菌生理盐水将孢子从培养基中洗下来制成孢子悬液,5 000 r/min 离心 5 min 收集菌体,加入蜗牛酶使其终质量分数为 2%。

2) 33℃水浴酶解 30,60,90,120,150 min,将酶解液转至 58℃水浴锅中处理 8 min 以杀死营养体细胞。

3) 将酶解液置于冰上,待完全冷却后倒入 50 mL 的离心管中,并在其中加入已灭菌的玻璃珠、生理盐水和液体石蜡,置于摇床上振荡 30 min,将菌液进行逐级稀释并取 10~5 倍稀释液涂布于 YPD 固体培养基,30℃恒温培养至长出单菌落。

4) 挑取单菌落在产孢培养基中再培养,在显微镜下观察子囊孢子的形成情况<sup>[12]</sup>。凡不形成子囊孢子的确定为单倍体,将单倍体菌株在 YPD 培养基中培养后甘油保种,冻存。

**1.2.3 单倍体菌株发酵性能** 将冻存菌株在 YPD 培养基中活化后,转入发酵培养基,测定菌浓、残糖及产物赤藓糖醇的生成情况。将赤藓糖醇产量较高的菌株用于后续实验。

**1.2.4 单倍体倍型验证** 设计引物 MAT-F、MAT- $\alpha$ 、MAT-a(见表 1)。MAT-F 位于 MAT 基因座右侧且指向 MAT 基因座;MAT- $\alpha$  位于 MAT $\alpha$  及 HMR $\alpha$  上的  $\alpha$ -特异性 DNA 上;MAT-a 位于 MATa 及 HMLa 上的 a-特异性 DNA 上<sup>[13]</sup>。将 3 条特异性引物加入 PCR 反应体系中, $\alpha$  倍型的菌株将产生 404 bp 的条带,a 倍型的单倍体菌株将产生 544 bp 的条带,双倍体菌株将在 404 bp 和 544 bp 处均有扩增条带。

表 1 单倍体倍型验证引物

Table 1 Primer of validation haploid type

引物名称	引物序列
MAT-F	5'-AGT CAC ATC AGG ATC GTT TAT GG-3'
MAT- $\alpha$	5'-GCA CGG AAT ATG GGA CTA CTT CG-3'
MAT-a	5'-ACT CCA CTT CAA GTA AGA GTT TG-3'

注:引物由上海生工生物工程有限公司合成。

**1.2.5 发酵液中赤藓糖醇测定** 采用 HPLC 法。色谱条件:色谱柱为 Alltech Prevail Carbohydrate ES (4.6 mm×250 mm,5 $\mu$ m),流动相为乙腈和水(体积比 75:25);体积流量为 1.0 mL/min;RI 2000 型示差折光检测器;柱温为 30  $^{\circ}$ C

**1.2.6 单倍体杂交及杂合子发酵性能测定** 将验证为 a 型和  $\alpha$  型的单倍体菌株混合接种于 YPD 液体培养基中,30  $^{\circ}$ C,200 r/min 摇床培养,镜检观察杂合子的接合情况。镜检杂交完成后吸取适量菌液,涂布于固体完全培养基,30  $^{\circ}$ C 恒温培养至长出单菌落。挑取单菌落在产孢培养基上划线,染色后在显微镜下观察子囊孢子的形成情况,能够形成子囊孢子的菌株确定为二倍体。将二倍体菌株接种于 YPD 培养基,30  $^{\circ}$ C,200 r/min 培养活化两次后转入发酵培养基,测定单倍体杂交后杂合子的菌株生长性能、赤藓糖醇合成情况及副产物甘油形成情况。

**1.2.7 其他检测方法** 子囊孢子检测采用染色法<sup>[14]</sup>,发酵液中葡萄糖的测定采用 3,5-二硝基水杨酸法<sup>[15]</sup>,菌体生物量测定采用分光光度法 DCW=0.485A<sub>600</sub>。

## 2 结果与分析

### 2.1 高产孢率培养基的筛选

研究两种不同产孢培养基中 *Torula sp.* B84512 菌株的产孢情况,任取 5 个视野,计算产孢率,结果如图 1 所示。*Torula sp.*B84512 菌株在 SPM 产孢培养基产孢率较小,培养 8 d 产孢率不到 10%;麦氏(Mcclary)培养基中的产孢率较大,且随着培养时间的延长产孢率逐渐增加,培养至 7 d 时产孢率达 45%以上,之后子囊孢子生成速率减慢,说明 7 d 为子囊孢子的最佳培养时间。因此选择 Mcclary 培养基为产孢培养基,培养时间为 7 d。

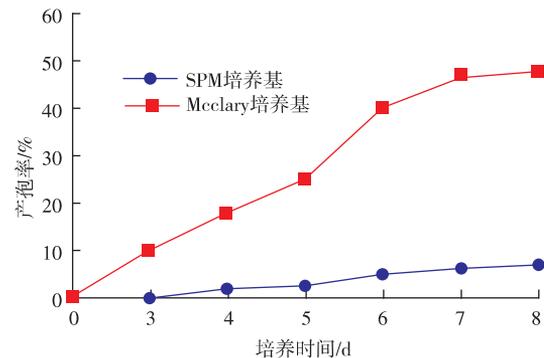


图 1 不同培养基及产孢时间对产孢率的影响

Fig. 1 Effective of sporulation rate by different sporulation medium and time

### 2.2 不同裂解时间对子囊孢子裂解率的影响

以蜗牛酶作用于圆酵母细胞壁,从图 2 可以看出,随着裂解时间的延长,子囊孢子的裂解率不断增加,150 min 时,裂解率达到 100%。因此,将蜗牛酶作用于细胞壁的裂解时间确定为 150 min。

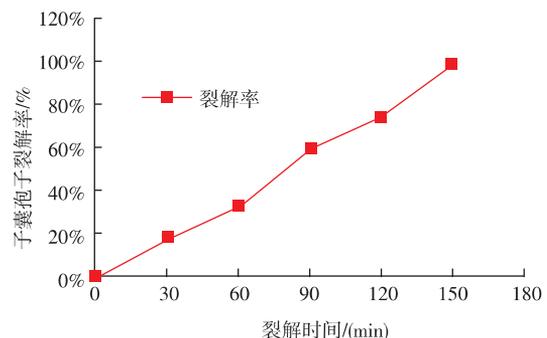


图 2 裂解时间对子囊孢子裂解率的影响

Fig. 2 Effect on cleavage rate of ascospores with different lysis time

### 2.3 单倍体的获得

按 1.2.2 中实验方法制备 *Torula sp.*B84512 单倍体, 经过一系列分离筛选共筛选出 10 株单倍体菌株, 菌落均呈白色、圆形, 且表面光滑, 极易挑取。挑取上述单倍体菌落进行染色并镜检验证, 结果如图 3 所示。圆酵母 B84512 的孢子多为 3 孢或 4 孢 (图 3(a)), 而单倍体菌株则不形成孢子 (图 3(b))。

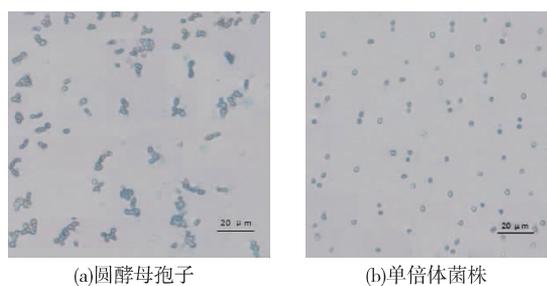


图 3 圆酵母 B84512 孢子和单倍体图

Fig. 3 Spores and the haploids of *Torula sp.*B84512

### 2.4 单倍体菌株发酵性能确定

将筛选出的 10 株单倍体菌株接种至发酵培养基中, 于 30°C, 200 r/min 培养 160 h, 测定残糖量、菌体量及赤藓糖醇产量, 测定结果如图 4 所示。由圆酵母 B84512 为出发菌株筛选出的 10 株单倍体菌株发酵性能相差较大, 说明圆酵母 B84512 的发酵能力由多个基因控制。其中单倍体菌株 *Torula sp.* B84512 -7、*Torula sp.*B84512 -8 及 *Torula sp.* B84512-9 对碳源消耗速率、菌体生长量及合成赤藓糖醇的能力均优于其他菌株。发酵 160 h 此 3 株单倍体菌株碳源消耗速率与亲本菌基本相同, 残糖量均小于 10 g/L。但菌体生物量以及赤藓糖醇产量均低于亲本菌, *Torula sp.*B84512 -7 及 *Torula sp.* B84512-9 菌体生物量为 60 g/L 左右, 可合成赤藓糖醇 100 g/L 左右, *Torula sp.*B84512-8 可发酵得到 82 g/L 赤藓糖醇, 菌体生物量为 58 g/L。将 3 株高产赤藓糖醇单倍体菌株于种子斜面培养基中传代 10 次, 菌体表型及菌株发酵性能稳定, 可作为基因工程育种的亲本。

### 2.5 单倍体倍型鉴定

单倍体倍型验证主要有 3 种方法: 1) 用实验室保藏的已知倍型的单倍体与未知倍型的酵母菌株进行杂交, 如果有哑铃型细胞产生, 说明两株菌可以杂交并为异倍体, 若不能则说明为相同倍型菌

株; 2) 用  $\alpha$  因子处理未知倍型的单倍体菌株, 若处理过的细胞呈现梨形, 说明此细胞为  $\alpha$  型, 反之则为  $\alpha$  型; 3) 采用 PCR 方法验证, 若 404 bp 处出现条带则为  $\alpha$  型, 在 544 bp 有条带为  $\alpha$  型, 404 bp 级 544 bp 处均有条带则为二倍体。作者采用 PCR 方法进行鉴定。

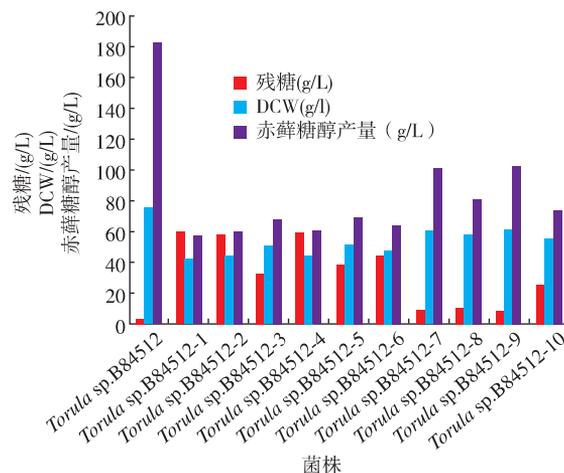
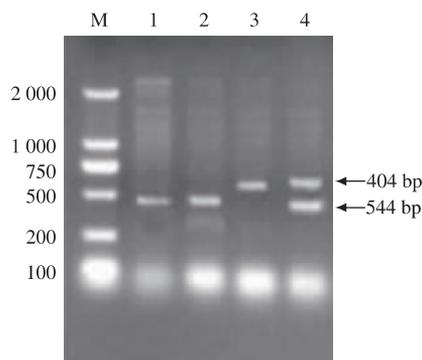


图 4 单倍体菌株与出发菌株发酵性能比较

Fig. 4 Comparison of fermentation process between haploid strains and original

从图 5 可以看出, *Torula sp.*B84512 亲本菌株为二倍体菌株; *Torula sp.* B84512 -7、*Torula sp.* B84512-8 菌株的倍型相同, 均为  $\alpha$  型; *Torula sp.* B84512-9 菌株为  $\alpha$  型。



M: DL marker 2501; Lane 1, 2, 3, 4: *Torula sp.* B84512-7, 8, 9 and *Torula sp.* B84512.

图 5 单倍体倍型鉴定

Fig. 5 Validation of haploid type

### 2.6 杂合子及杂合子发酵性能测定

单倍体细胞具有结合能力, 在杂合过程中, 不同交配型的单倍体菌株在合适的营养条件下, 通过

细胞间的相互识别、相互交配,通过质配、核配,最后融合成一个完整的二倍体菌株。在两个细胞的结合过程中会出现哑铃型细胞,哑铃型细胞的检出可以作为是否杂交的一种方法。将 *Torula sp.* B84512-7、*Torula sp.* B84512-8、*Torula sp.* B84512-9 这 3 株单倍体双双进行杂交,单倍体混合培养 4 h 开始出现少量哑铃型细胞,随着时间的延长,相互作用增加,哑铃型细胞逐渐增加,60 h 后哑铃型细胞变少,且细胞个体较大,视为杂交完成,得到杂合子 *Torula sp.* B84512-78、*Torula sp.* B84512-89、*Torula sp.* B84512-79 共 74 株。将杂合子接种于发酵培养基中,在 3 种杂合子中分别筛选出生物量较高的菌株。将 3 株菌再次活化后接种于发酵培养基中,测定赤藓糖醇的产量并与原始菌进行比较(图 6)。

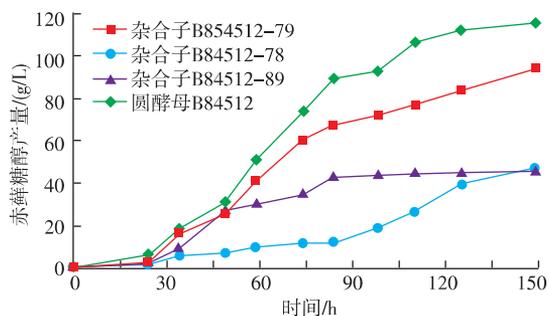


图 6 杂合子发酵产赤藓糖醇比较

Fig. 6 Comparison of erythritol yield by Heterozygous 3 株杂合子的发酵性能均低于原始菌株,发酵

148 h, *Torula sp.* B84512-79 的赤藓糖醇产量最高,达到 97 g/L,与单倍体亲本发酵性能相当;而 *Torula sp.* B84512-89 及 *Torula sp.* B84512-78 发酵产赤藓糖醇产量较低,为 40 g/L 左右,低于单倍体亲本。可见,单倍体 *Torula sp.* B84512-7 和 *Torula sp.* B84512-9 具有较好的发酵性能,可作为基因工程育种的单倍体亲本应用于研究。

### 3 结 语

赤藓糖醇广泛应用于食品、医药、化工等各方面,可经化学法或生物法合成。以圆酵母 B84512 为研究对象,在不同产孢培养基上进行产孢实验,表明最佳产孢培养基为 Mcclary 培养基,培养条件为 30℃,7 d,产孢率为 45% 左右;筛选出 10 株单倍体菌株,其中 3 株在发酵培养基中合成赤藓糖醇产量相对较高,分别命名为 *Torula sp.* B84512-7、*Torula sp.* B84512-8 及 *Torula sp.* B84512-9,经 PCR 方法验证前两者为 α 型,后者为 a 型;将 3 株单倍体两两杂合,发现杂合子 *Torula sp.* B84512-79 的发酵性能最佳,赤藓糖醇产量高达 97 g/L。赤藓糖醇产量较高的单倍体亲本 *Torula sp.* B84512-7 及 *Torula sp.* B84512-9 可用于基因工程育种。

应用基因工程育种的方法提高赤藓糖醇工业生产菌株发酵性能的研究鲜见报道,本文中初步探索了赤藓糖醇生产菌株圆酵母的单倍体制备技术,为进一步研究该菌株的基因工程操作奠定了基础。

### 参考文献:

- [1] 张新明,李宏,朱永辉. 几种多元糖醇的比较[J]. 山东食品发酵,2007(4):36-39.  
ZHANG Xin-ming, LI Hong, ZHU Yong-hui. Comparison of several multi sugar alcohol [J]. *Shandong Food Ferment*, 2007(4):36-39. (in Chinese)
- [2] Gertjan J M, Agnes W B, Aline A P, et al. Erythritol is a sweet antioxidant[J]. *Nutrition*, 2010, 26(4):449-458.
- [3] Moon H J, Jyea M, Kim I W, et al. Biotechnological production of erythritol and its applications [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 86(4):1017-1025.
- [4] 刘建军,赵祥颖,田延军,等. 低热值甜味剂赤藓糖醇的研究现状及应用[J]. 中国酿造,2006(12):1-3,16.  
LIU Jian-jun, ZHAO Xiao-yin, TIAN Yan-jun, et al. Current research situation and application of erythritol as low-cal sweetener [J]. *China Brewing*, 2006(12):1-3,16. (in Chinese)
- [5] Kundimi S, Yeldur P Venkatesh. Analysis of erythritol in foods by polyclonal antibody-based indirect competitive ELISA[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2008, 391:609-615.
- [6] Mmro I C, Beret W O, Borzeleca J F, et al. Erythritol: An interpretive summary of biochemical, metabolic, toxicological and clinical data[J]. *Food Chem Toxicology*, 1998, 36:1139-1174.
- [7] Ishizuka H, Wako K, Kasumi T, et al. Purification and some properties of an erythrose reductase from an *Aureobasidium sp.*

- mutant[J]. **Biosci Biotech Biochem**, 1992, 56: 941-945.
- [8] 张建炜,肖东光,张翠英. 优良黄酒酵母单倍体的分离筛选[J]. 酿酒科技, 2010(5): 36-41.  
ZHANG Jian-wei, XIAO Dong-guang, ZHANG Cui-ying. Screening of haploid of quality yellow rice wine yeast [J]. **Liquor-Making Science & Technology**, 2010(5): 36-41. (in Chinese)
- [9] 吕艳蓓,王昌禄,陈军. 酿酒酵母菌单倍体分离及其呼吸缺陷型的选育[J]. 酿酒科技, 2005(5): 45-47.  
LU Yan-bei, WANG Chang-lu, CHEN Jun. Haploid separation of distillers yeast and breeding of its respiration defect type[J]. **Liquor-Making Science & Technology**, 2005(5): 45-47. (in Chinese)
- [10] 李华,刘丽丽,李娟. 酿酒酵母产孢培养基的筛选及单倍体的分离[J]. 酿酒科技, 2008(6): 22-27.  
LI Hua, LIU Li-li, LI Juan. The screening of sporogenous medium and haploid separation of *Saccharomyces Cerevisiae* [J]. **Liquor-Making Science & Technology**, 2008(6): 22-27. (in Chinese)
- [11] Kloimwieder A, Winston F. A screen for germination mutants in *saccharomyces cerevisiae* [J]. **Scerevisiae Germination Mutants**, 2011, 1(1): 143-149.
- [12] Reiling J H, Clish C B, Carette J E, et al. A haploid genetic screen identifies the major facilitator domain containing 2A (MFSD2A) transporter as a key mediator in the response to tunicamycin[J]. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2011, 108(29): 11756-11765.
- [13] 朱旭芬,吴雪昌,曾云中. 酿酒酵母产孢条件及核倍性分析[J]. 科技通报, 2002, 18(5): 157-163.  
ZHU Xu-fen, WU Xue-chang, ZENG Yun-zhong. The analysis of spoulation condition and nuclear multiploid of therm otolerant yeast[J]. **Bulletin of Science and Technology**, 2002, 18(5): 157-163. (in Chinese)
- [14] Layton J E. Undertaking a successful gynogenetic haploid screen in zebrafish [J]. **Methods in Molecular Biology**, 2009, 54(6): 31-44.
- [15] 赵凯,许鹏举,谷广焯. 3,5-二硝基水杨酸比色法测定还原糖含量的研究[J]. 食品科学, 2008, 29(8): 534-536.  
ZHAO Kai, XU Peng-ju, GU Guang-ye. Study on determination of reducing sugar content using 3,5-dinitrosalicylic acid method [J]. **Food Science**, 2008, 29(8): 534-536. (in Chinese)

## 科技信息

欧盟食品安全局就锰的膳食参考值发表科学意见

食品伙伴网讯 据欧盟网站消息,2013年11月4日欧盟食品安全局就锰的膳食参考值发表科学意见,建议成年人(包含孕妇及哺乳期妇女)适宜摄入量(AI)为3 mg/天,7-11个月婴儿 AI 范围为0.02-0.5 mg/天,1-3岁儿童 AI 为0.5 mg/天,青少年 AI 为3 mg/天。

[信息来源] 食品伙伴网. 欧盟食品安全局就锰的膳食参考值发表科学意见 [EB/OL]. (2013-11-7). <http://news.foodmate.net/2013/11/247869.html>

台湾地区制定食用藻类中脱镁叶绿酸盐的检验方法

2013年11月13日,台湾地区“卫生福利部”发布部授食字第1021950910号公告,订定“食用藻类中脱镁叶绿酸盐的检验方法”,并自即日生效。方法详情参见:<http://www.xmtbt-sps.gov.cn/download.asp?id=6294>

[信息来源] 厦门 WTO 工作站. 台湾地区制定食用藻类中脱镁叶绿酸盐的检验方法[EB/OL]. (2013-11-18). <http://www.xmtbt-sps.gov.cn/detail.asp?id=43815>.